

# Respuesta humoral y consecuencias reproductivas en ovejas desafiadas con *Brucella ovis* al final de la gestación

FERNANDO A. PAOLICCHI<sup>1,5</sup>, MARTA NUÑEZ<sup>1</sup>, MARÍA A. FIORENTINO<sup>1</sup>, ROSANA C. MALENA<sup>1</sup>, MARCOS TRANGONI<sup>2</sup>, SILVIO CRAVERO<sup>2</sup>, SILVIA M. ESTEIN<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Producción Animal, INTA Balcarce;

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar; <sup>3</sup> Laboratorio de Inmunología, Depto. SAMP, Centro de Investigaciones Veterinarias Tandil (CIVETAN)-CONICET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil; <sup>4</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); <sup>5</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: fpaolicchi@balcarce.inta.gov.ar

## RESUMEN

La brucelosis ovina por *Brucella ovis* es una enfermedad de prevalencia alta en Argentina. Para evaluar la patogenicidad de *B. ovis* y la respuesta serológica durante el último mes de gestación, 6 ovejas se distribuyeron en dos grupos: G1, ovejas preñadas, n = 4 y G2, ovejas no preñadas, n = 2. Tres ovejas del G1 (15 días preparto) y una del G2 fueron inoculadas con *B. ovis*. Se analizaron muestras de suero mediante diferentes pruebas serológicas. Se realizó aislamiento y PCR a partir de mucus cérvico-vaginal (mcv), placenta y leche. En las muestras de placenta se realizó histopatología. Las hembras del G1 parieron corderos vivos; se detectaron anticuerpos en las ovejas desafiadas del G1 a partir de los 5 días posinoculación. El mcv de las ovejas desafiadas resultó negativo al aislamiento en ambos grupos. Las muestras de leche del G1 fueron positivas por cultivo y PCR a *B. ovis*. La técnica de PCR resultó positiva en las placentas de las ovejas desafiadas del G1. La histopatología reveló una placentitis necrótica supurativa en una de las ovejas desafiadas. El desafío con *B. ovis* preparto resultó en la invasión de la placenta y de la glándula mamaria, con la consecuente excreción de la bacteria por leche. La infección con *B. ovis* indujo una respuesta humoral temprana en las ovejas. La colonización de la placenta por *B. ovis* y la excreción de la bacteria por la leche sugieren un potencial riesgo de infección activa para los corderos y la posibilidad de que estos se comporten como portadores latentes de la infección.

**Palabras clave:** *Brucella ovis*, gestación, leche, placenta, pruebas serológicas, PCR

## ABSTRACT

**Immune response and reproductive consequences in experimentally infected ewes with *Brucella ovis* during late pregnancy.** Ovine brucellosis by *Brucella ovis* is a highly prevalent disease in Argentina. This study aimed to evaluate the pathogenicity of *B. ovis* and the serological response in ewes during late pregnancy and in their offspring. Six adult ewes were distributed in two groups G1 (pregnant females, n = 4) and G2 (nonpregnant females, n = 2). Three pregnant ewes at 15 days prepartum and one nonpregnant ewe were inoculated with *B. ovis*. Sera of sheep and their offspring were analyzed by different serological tests. Samples of cervicovaginal mucus, placenta and milk were studied by bacteriology. A *Brucella* genus-specific PCR assay was carried out in placenta and milk samples. Placenta samples were histopathologically processed. G1 females gave birth to live lambs, but one died hours postpartum. Serological techniques employed detected antibodies in serum of inoculated pregnant animal 5 days postchallenge. Sera of female controls G1 and G2 remained negative throughout the study. Cervicovaginal mucus of infected ewes in G1 and G2 yielded negative results to bacteriology, but *B. ovis* was isolated from milk. The PCR assay was positive for the placenta and milk from inoculated pregnant ewes. Histopathology revealed necrotic suppurative placentitis in one placenta. However, although results demonstrated that *B. ovis* can invade the placenta and mammary gland, this bacterium did not cause abortion when it was inoculated intravenously at 15 days prepartum. *B. ovis* infection induced an early humoral response in pregnant ewes, but their lambs remained seronegative, indicating that there was no transfer of antibodies in infancy. Placenta colonization and milk excretion of *B. ovis* involves a potential source of infection for lambs, which could play a role as latent carriers of infection.

**Key words:** *Brucella ovis*, gestation, placenta, milk, serological tests, PCR

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis ovina causada por *Brucella ovis* es una enfermedad infectocontagiosa que afecta al ganado ovino y que se caracteriza por provocar epididimitis e infertilidad en el carnero (3). La transmisión de la infección se produce por la vía venérea durante la estación reproductiva, o entre machos cuando existe sodomía u olfateo prepucial (5). Además, se ha sugerido la vía congénita como una ruta probable de infección; sin embargo, la presencia de anticuerpos en el calostro contribuiría a la eliminación de *B. ovis* en el cordero (6, 7, 10). En la oveja preñada, la infección natural puede provocar mortalidad embrionaria con infertilidad transitoria, placentitis, aborto tardío (9, 12, 17) o el nacimiento de corderos débiles, que mueren a las pocas horas o días de nacidos (14). Esta enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial y ocasiona importantes pérdidas económicas en la producción ovina debido a la disminución en los porcentajes de preñez, parición y corderos vivos al momento del destete en las majadas infectadas (11).

En la oveja preñada, el diagnóstico bacteriológico se apoya en el aislamiento de *B. ovis* a partir de muestras de mucus cérvico-vaginal, placenta, leche y/o tejidos de los fetos abortados (1). Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una prueba sensible que permite detectar en fluidos y tejidos fragmentos del ADN de distintas especies de *Brucella* (2, 4, 25).

El diagnóstico indirecto se basa en el empleo de pruebas serológicas que detectan anticuerpos específicos, algunas de las cuales son la fijación de complemento (FC) (3), la inmunodifusión en gel de agarosa con extracto salino de *B. ovis* (IDGA-HS) (19) y el ensayo inmunoquímico indirecto (ELISAi) con antígeno lipopolisacárido rugoso (LPS-R) (ELISAi LPS-R *B. ovis*) (24). En la actualidad existen, además, otras pruebas serológicas que emplean como antígeno a *B. canis*, que es la otra especie rugosa del género *Brucella* y que comparte epitopes con *B. ovis*. Estas pruebas incluyen la aglutinación rápida en placa (Rapid Slide Agglutination Test o RSAT) (8) y la técnica de ELISAi contra *B. canis* (ELISAi *B. canis*) (15).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar en ovejas preñadas e infectadas al final de la gestación: a) la patogenicidad de *B. ovis*, b) la colonización bacteriana de la placenta y de la glándula mamaria, y c) la respuesta serológica en estas hembras y en sus crías.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se emplearon 6 ovejas adultas de la raza Romney Marsh

pertenecientes a un establecimiento libre de brucelosis ubicado en la provincia de Buenos Aires (Argentina) y dedicado a la producción ovina. Al inicio del ensayo, todas las ovejas presentaron un estado sanitario óptimo y resultaron seronegativas al ELISAi LPS-R *B. ovis*. Las ovejas fueron alojadas en corrales de la EEA INTA Balcarce, con alimentación *ad libitum* compuesta por una ración balanceada y pastura natural. Los animales se identificaron con números mediante aretes plásticos y se distribuyeron al azar en los siguientes grupos experimentales:

- Grupo 1 (G1): cuatro ovejas (N.º 1, 2, 3 y 4) fueron sincronizadas mediante inducción con 60 mg de medroxiprogesterona impregnada en esponja. A los 14 días se extrajo la esponja y se inyectaron 200 UI de hormona PMSG vía parenteral. Cuarenta y ocho horas más tarde fueron inseminadas con 300 µl de semen fresco (dosis total 4 x 10<sup>8</sup> espermatozoides) extraído de un carnero Romney Marsh de probada fertilidad y libre de brucelosis.

- Grupo 2 (G2): dos ovejas (N.º 5 y 6) sin inseminar y no preñadas.

### Diagnóstico de preñez

Se realizó ecografía transvaginal a las ovejas del G1 los días 38, 53 y 68 posinseminación artificial con el fin de monitorear el estado de preñez y registrar pérdidas embrionarias durante el período predesafío.

### Preparación del inóculo

Se utilizó la cepa de referencia *B. ovis* PA76250 (INRA, Nouzilly, Francia) conservada a -80 °C en el cepario de la Facultad de Ciencias Veterinarias, U.N.C.P.B.A. En el momento de su uso fue recuperada mediante siembra en agar tripteína de soja adicionado con 0,5 % de extracto de levadura (TSAYE) y 5 % de suero equino en atmósfera con 10 % de CO<sub>2</sub>. Para incrementar su virulencia, esta cepa fue inoculada en ratones BALB/c, y recuperada a partir del bazo en el mismo medio de cultivo a los 21 días posinoculación. Se preparó el inóculo para el desafío de las ovejas y la concentración final determinada por recuento retrospectivo fue de 6,2 x 10<sup>6</sup> UFC/ml (18).

### Desafío con *Brucella ovis*

Tres ovejas del G1 (N.º 1, 2 y 3) fueron desafiadas a los 135 días de gestación mediante venopunción yugular con 1 ml del inóculo; una de las ovejas del G2 (N.º 6) fue desafiada del mismo modo, en la misma fecha. Las dos ovejas restantes de cada grupo (N.º 4 y N.º 5) no fueron inoculadas y permanecieron como controles sin desafiar. A partir del momento del desafío y una vez por semana hasta el momento del parto de las ovejas preñadas, se realizaron los registros térmicos vía transrectal y la toma de muestras de sangre por punción yugular para la obtención de suero para análisis serológico. En el momento de las pariciones se registraron los siguientes datos: viabilidad de las crías y retención de placenta. Los corderos fueron pesados el día del nacimiento; se verificó su condición sanitaria clínica y se identificaron con aretes plásticos numerados.

### Estudios bacteriológicos y moleculares

En las ovejas del G1 se tomaron muestras de placenta en el momento del parto y también de mucus cérvico-vaginal y de leche a los 8, 15, 30, 45 y 60 días posparto. Las muestras obtenidas se colocaron en recipientes estériles y fueron procesadas para su cultivo en placas con agar sangre Columbia (Oxoid Ltd, Wad Road, Basingstoke, Inglaterra) adicionado con 7 % de sangre bovina desfibrinada estéril y agar Skirrow con antibióticos (23). Se incubó a 37 °C en



patógenos de importancia reproductiva en ovinos. Se aisló *B. ovis* de las muestras de leche de dos ovejas desafiadas del G1 (N.º 1 y 3) a partir de los 30 días posparto (Tabla 1). Por otro lado, las muestras de leche de las ovejas desafiadas del G1 (N.º 1, 2 y 3) resultaron positivas por PCR a partir del día 8 posparto (Figura 2), esto es, 22 días antes de obtener resultado positivo en el cultivo bacteriológico de leche. La prueba de PCR aplicada a las muestras de placenta de las ovejas del G1 dio resultado positivo en 2 de las 3 ovejas inoculadas (N.º 1 y 3) (Tabla 1). La oveja N.º 4 del G1 (control no desafiada) resultó negativa a la bacteriología y a la PCR en las muestras obtenidas posparto.

### Serología

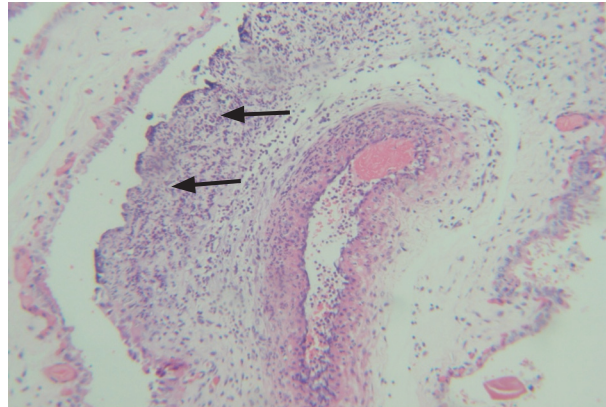
A partir del día 5 posdesafío se detectaron anticuerpos en una de las ovejas del G1 (N.º 1) mediante la prueba de RSAT. Dos de las ovejas desafiadas del G1 (N.º 1 y 3) resultaron positivas a la prueba de IDGA-HS a partir del día 12 posdesafío. La otra oveja inoculada de este grupo (N.º 2) resultó positiva a las pruebas de RSAT e IDGA-HS a partir de los días 33 y 40 posdesafío, respectivamente. Las tres ovejas desafiadas del G1 permanecieron positivas hasta la finalización del ensayo (Tabla 2). Las ovejas del G2 (no preñadas), tanto la control como la desafiada (N.º 5 y 6, respectivamente), resultaron siempre negativas a las pruebas de RSAT e IDGA-HS. Las ovejas N.º 1, 2 y 3 del G1 resultaron positivas al ELISAI LPS-R para *B. ovis* a partir de los días 12, 54 y 26 posdesafío, respectivamente. Por otro lado, en la oveja desafiada del G2 (N.º 6), este ELISA detectó títulos positivos con dos picos en los días 33 y 54 posdesafío (Figura 3). Las ovejas N.º 1, 2 y 3 reaccionaron en el ELISAI para *B. canis* a partir de los días 19, 26 y 40 posdesafío, respectivamente. La oveja control del G1 (N.º 4) y las dos ovejas del G2 (N.º 5 y 6) resultaron negativas a esta técnica en el periodo de estudio (Figura 4). Los sueros de los corderos resultaron negativos en el ELISAI para *B. ovis*.

### Histopatología

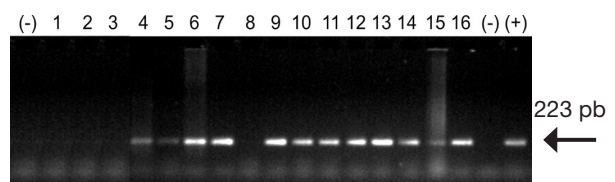
En la oveja N.º 3 del G1 se observó una placentitis necrótica supurativa epitelial y perivasculitis con presencia de polimorfonucleares neutrófilos (Figura 1). En el resto de las ovejas del G1 no se observaron lesiones histológicas placentarias.

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo fueron evaluadas las consecuencias reproductivas y la respuesta inmunitaria humoral en ovejas con preñez avanzada



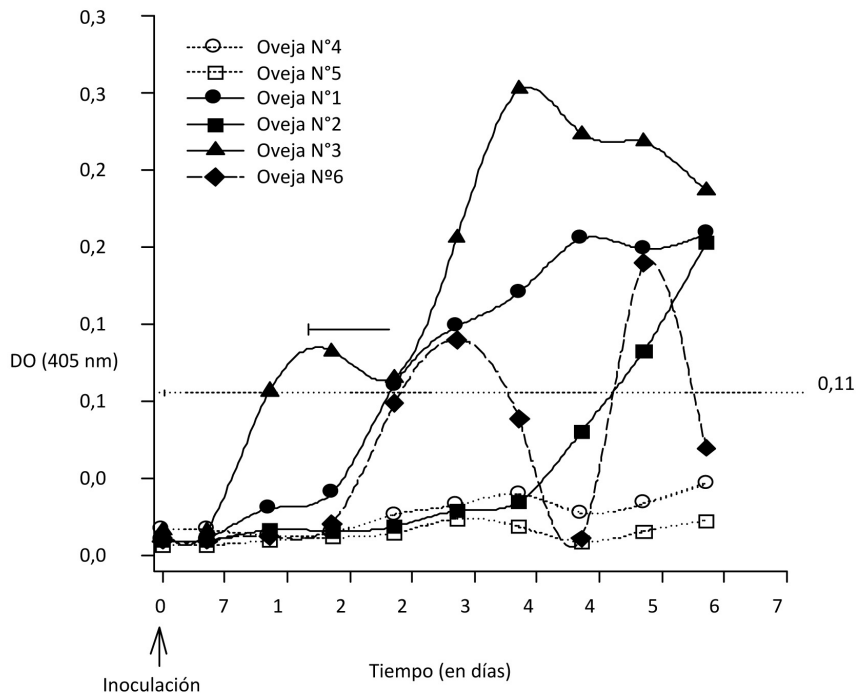
**Figura 1.** Placentitis supurativa (oveja N.º 3). Las flechas indican el área con mayor concentración de polimorfonucleares neutrófilos. Hematoxilina y eosina, aumento 100X.



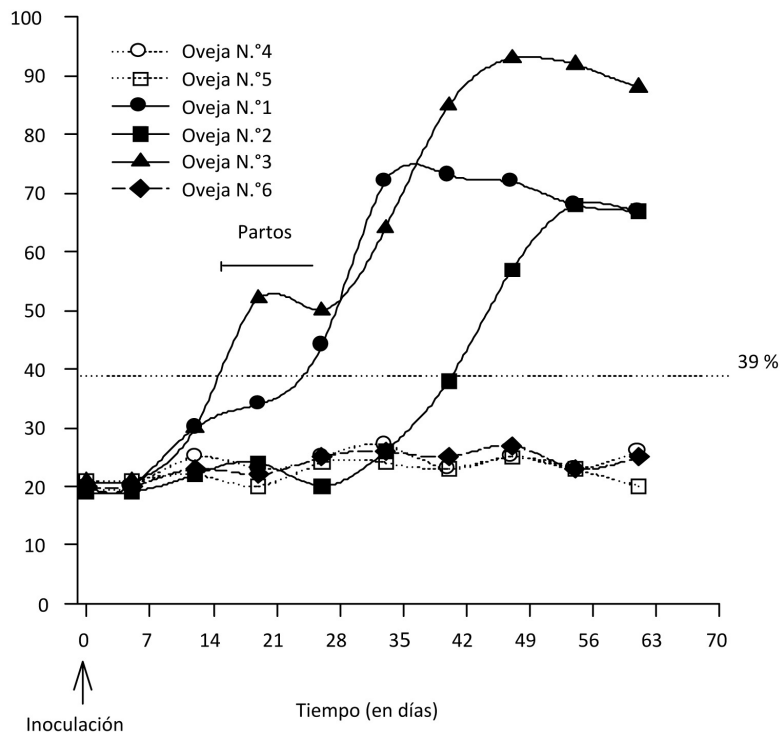
**Figura 2.** Resultados del análisis por PCR de leche y placenta de las ovejas del grupo G1. (-) Control negativo de reacción (mezcla sin muestra). Líneas 1-3: leche de oveja N.º 4 (control no desafiada); línea 4: placenta de oveja N.º 1; líneas 5-7: leche de oveja N.º 1; línea 8: placenta de oveja N.º 2; líneas 9-11: leche de oveja N.º 2; línea 12: placenta de oveja N.º 3; líneas 13-16: leche de oveja N.º 3; (+) control positivo de ADN de *B. ovis* REO 198. Las muestras de leche corresponden a los diferentes tiempos de muestreo posparto.

de 135 días, tras la inoculación con *B. ovis*. El experimento fue diseñado con el objetivo de estudiar las probables consecuencias epidemiológicas que conllevaría la infección de ovejas sanas con *B. ovis* durante la preñez avanzada, expuestas a la infección por cohabitar el predio con abortos de ovejas infectadas en la majada. En nuestro trabajo el desafío con la cepa patógena de *B. ovis* PA76250 en la preñez avanzada no provocó abortos ni alteraciones en el periodo de gestación normal, y la cepa de desafío no fue recuperada por cultivo bacteriológico de las placentas ni del mucus cérvico-vaginal de las ovejas desafiadas. Sin embargo, 2 de las 3 muestras de placentas del grupo desafiado (G1) resultaron positivas por la técnica de PCR y, además, una de estas muestras placentarias presentó lesiones histopatológicas compatibles con una placentitis necrótica por *B. ovis*.

La dosis de desafío de *B. ovis* y la vía de inoculación empleadas en este experimento coinciden con lo informado por Ris (22). Otros autores han empleado dosis superiores ( $10^8$  UFC,  $10^9$  UFC) y otras vías de



**Figura 3.** Evolución de los niveles de anticuerpos séricos de las ovejas de los grupos G1 y G2 medidos mediante ELISA-anti LPS-R *B. ovis*. Valores de referencia: negativo: DO 0-0,094; sospechoso: DO 0,095-0,119; positivo: DO > 0,120.



**Figura 4.** Evolución de los niveles de anticuerpos séricos de las ovejas de los grupos G1 y G2 medidos mediante ELISA-anti *B. canis*. Valor de referencia: positivo % > 39.

**Tabla 2.** Resultados serológicos de las pruebas de IDGA-HS y RSAT en ovejas de los grupos G1 y G2

Grupo	Oveja N.º		Días posdesafío									
			0	5	12	19	26	33	40	47	54	61
G1	1	IDGA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		RSAT	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	IDGA	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
		RSAT	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	IDGA	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		RSAT	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	4 (control)	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		RSAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5 (control)	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		RSAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	RSAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

IDGA: inmunodifusión en gel de agarosa; RSAT: *rapid slide agglutination test*.

infección (intraconjuntival, intravaginal e intrauterina), se obtuvieron en todos los casos entre 63 y 75 % de infección placentaria (10, 12, 17). Nuestros resultados sugieren que el tiempo de gestación en el cual se realizó el desafío y la concentración de bacterias utilizada para el desafío fueron adecuados para que *B. ovis* colonizara la placenta, pero no suficientes para provocar abortos o el nacimiento de corderos infectados. Asimismo, en otros ensayos en los que se efectuó la inoculación experimental en etapas tempranas o avanzadas de la gestación, los resultados revelan que si bien *B. ovis* genera una endometritis grave, la bacteria posee una reducida capacidad para inducir abortos en ovejas o la muerte perinatal de los corderos (10, 13).

En referencia a la colonización por *B. ovis* en las ovejas desafiadas del G1, el resultado positivo a la PCR en leche a partir de los 8 días posparto indicaría que, a pesar del estado avanzado de la gestación cuando

se realizó el desafío, *B. ovis* se localizó en la glándula mamaria, lo que dio como resultado la excreción permanente de *B. ovis* en este fluido. Aunque en nuestro trabajo no se comprobó la infección de los corderos durante el periodo estudiado, trabajos previos han demostrado que la infección mamaria y de los linfonódulos adyacentes favorece la infección de los corderos durante la lactancia, el desarrollo de infecciones latentes y la persistencia de la infección en la majada, sin la intervención directa por vía venérea de los carneros (10, 16).

La persistencia de los títulos serológicos y la infección en ovejas enfermas con *B. ovis* por más de un año indican que la infección persiste de una estación reproductiva a la siguiente, lo que ocasiona la aparición de animales infectados por brucelosis (10, 21). En nuestro trabajo, la respuesta serológica específica contra *B. ovis* detectada en todas las ovejas preñadas e infectadas en las

primeras semanas posdesafío demuestra la utilidad de diferentes pruebas serológicas que incluyeron antígenos homólogos y heterólogos (*B. canis*). En efecto, tanto las técnicas de ELISAi, reconocidas por su mayor sensibilidad y especificidad, como las pruebas de IDGA-HS y RSAT permitieron identificar en animales preñados la infección con *B. ovis*. En contraste, en la oveja no preñada e infectada se observó una respuesta serológica intermitente solo mediante la prueba de ELISAi para *B. ovis*. Si bien los datos corresponden a un animal, no hemos encontrado en la bibliografía consultada información sobre la respuesta serológica en ovejas infectadas no preñadas.

*Brucella ovis* inoculada en ovejas al final de la gestación coloniza la placenta y la glándula mamaria y estimula la producción de anticuerpos específicos detectables en el suero en las primeras semanas posinfección. Por lo tanto, el diagnóstico serológico aplicado en este tipo de animales gestantes resulta útil para identificar las ovejas positivas antes de que se produzca el aborto o el nacimiento de los corderos y la consiguiente eliminación de material infeccioso dentro de la majada.

El empleo de la técnica de PCR aplicada a muestras de leche de ovejas constituye un método diagnóstico alternativo o complementario al cultivo bacteriológico, ya que es una prueba rápida y sensible que permite detectar fragmentos específicos de ADN prescindiendo de la viabilidad de la bacteria y aun ante la presencia de otros microorganismos contaminantes (2). A su vez, los resultados obtenidos con la aplicación de la PCR a la leche materna permitieron la detección precoz de la infección en relación con la bacteriología. Si bien no se pudieron realizar estudios por PCR en los órganos del cordero muerto, el uso de esta técnica con este material obtenido de abortos permitiría aumentar la probabilidad de obtener resultados positivos a la infección por *Brucella*.

En conclusión, la correcta identificación en cualquier época del año de los animales posiblemente infectados con *B. ovis* permitiría mejorar el estatus sanitario de las explotaciones ovinas con brucelosis y contribuiría a reducir el riesgo de reinfección de las ovejas en estas majadas infectadas. El uso complementario de varias pruebas de diagnóstico serológico, bacteriológico y de biología molecular aplicadas a las muestras de leche y/o de placenta de las ovejas que abortaron aumentaría el espectro de posibilidades de identificación temprana de *B. ovis*.

**Agradecimientos:** a los Dres. Nidia Lucero y Gustavo López (INEI-ANLIS Dr. "Carlos G. Malbrán", Ciudad Autónoma de Buenos Aires) por la asistencia en la realización de las pruebas serológicas de RSAT y ELISA indirecto *B. canis*.

## REFERENCIAS

1. Alton GG, Angus RM, Jones LM, Verger JM. *Brucella ovis*. In: INRA, editor. Laboratory techniques for the brucellosis laboratory, 1st edition. Paris, 1988, p. 155-85.
2. Baily G, Krahn J, Drasar B, Stoker N. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 1992; 95: 271-5.
3. Blasco J. Brucelosis ovina. Ovis 1990; 8: 1-69.
4. Bricker B, Halling S. Differentiation of *Brucella abortus* bv 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella suis* bv 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2660-6.
5. Buddle M. Observation on the transmission of *Brucella* infection in sheep. N Z Vet J 1955; 3: 10-9.
6. Bulgin MS. Epididymitis in rams and lambs. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1990; 6: 683-90.
7. Burgess G. Ovine contagious epididymitis: a review. Vet Microbiol 1982; 7: 551-75.
8. Carmichael L, Joubert J. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M) organism as antigen. Cornell Vet 1987; 77: 3-12.
9. Collier J, Molello J. Comparative distribution of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* in experimentally infected pregnant sheep. Am J Vet Res 1964; 107: 930-4.
10. Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, Blasco JM. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. Vet Rec 1999; 144: 555-8.
11. Homse A, Casaro A, Campero C, Paolicchi F, Terzolo H. Infección experimental en ovejas por *Brucella ovis*. Rev Med Vet 1994; 75: 302-6.
12. Hartley W, Jebson J, McFarland D. The artificial infection of sheep with a *Brucella*-like organism. Part I: The artificial infection of ewes. N Z Vet J 1954; 2: 80-5.
13. Hughes KL. Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. 1. Breeding performance of infected ewes. Aust Vet J 1972; 48: 12-7.
14. Libal M. Ovine abortion caused by *Brucella ovis*. In: Clyde Kirkbride, editor. Laboratory Diagnosis of Livestock Abortion, 3rd edition. Ames, Iowa State University Press, 1990, p. 27-9.
15. López G, Ayala SM, Escobar GI, Lucero N. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. Vet Microbiol 2005; 105: 181-7.
16. Marco J, González L, Cuervo L, Beltran de Heredia F, Barberán M, Marin C, Blasco J. *Brucella ovis* infection in two flocks of sheep. Vet Rec 1994; 135: 254-6.
17. McGowan B, Biberstein E, Harrold B, Robinson E. Epididymitis in rams: the effect of the ram epididymitis organism (REO) on the pregnant ewe. Proc US Live Stock Sanit Assoc 1961; 65: 291-6.
18. Miles A, Misra S. The estimation of the bactericidal power of the blood. J Higiene 1938; 38: 732-49.
19. Myers D, Jones L, Varela Díaz V. Studies of antigen

- for complement fixation and gel diffusion test in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and others *Brucella*. *Appl Microbiol* 1972; 23: 894-902.
20. Paolicchi FA, Terzolo H, Malena R, Morsella C. Estudio comparativo de medios de cultivo para aislar *Brucella ovis*. *Rev Argent Microbiol* 1991; 23: 155-9.
21. Paolicchi FA, Silva Paulo P, Solanet C, Eberhardt A, Malena R, Fiorentino MA, Vigliocco A. Aislamiento de *Brucella ovis* del tracto genital y leche de ovejas con persistencia de títulos positivos a ELISA. *Rev Med Vet* 2007; 88: 62-6.
22. Ris D. The bacteriology and serology of ewes inoculated with viable *Brucella ovis* organism. *N Z Vet J* 1970; 18: 2-6.
23. Terzolo H, Paolicchi FA, Moreira AR, Homse A. Skirrow agar for simultaneous isolation of *Brucella* and *Campylobacter* species. *Vet Rec* 1991; 129: 531-2.
24. Vigliocco A, Silva Paulo P, Mestre J, Briones G, Draghi G, Tossi M, Nielsen K. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* 1997; 54: 357-68.
25. Xavier MN, Teane M, Silva EA, Costa TA, Paixão VS, Moustacas, Robles CA, Gouveia AMG, Lage AP, Tsois RM, Santos R. Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol* 2010; 145: 158-64.

Recibido: 11/09/2012 – Aceptado: 07/12/2012